

УДК 577.112+611.018.52+576.52

# Вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини

А.О. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков, Я.М. Рока-Мойя, С.І. Діордієва, Т.В. Гриненко

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; e-mail: [artem\\_tykhomyrov@ukr.net](mailto:artem_tykhomyrov@ukr.net)

*Оцінювали вплив Lys-плазміногену на секрецію  $\alpha$ -гранул тромбоцитів. Як маркер екзоцитозу використовували Р-селектин, рівень експонування якого на плазматичній мембрані відмитих тромбоцитів людини визначали із застосуванням протокової цитофлуориметрії. Встановлено, що Lys-плазміноген викликає неповне вивільнення вмісту  $\alpha$ -гранул, однак пригнічує тромбініндуковану секрецію тромбоцитів. Його ефекти на секреторні процеси у тромбоцитах не пов'язані з утворенням активної протеїнази плазміну, а, вірогідно, реалізуються завдяки взаємодіям некаталітичних (кринглових) доменів молекули з мембранними рецепторами. На відміну від Lys-форми, нативний проензим (Glu-плазміноген) не викликав змін секреторної активності тромбоцитів. Отже, вперше продемонстровано здатність Lys-плазміногену модулювати секрецію  $\alpha$ -гранул тромбоцитів, що може розглядатися як один з можливих механізмів реалізації його антиагрегативної активності. Ключові слова: тромбоцити; секреція тромбоцитів;  $\alpha$ -гранули; Р-селектин; плазміноген; протокова цитофлуориметрія.*

## ВСТУП

Плазміноген/плазмінова система відіграє ключову роль у руйнуванні фібринових згустків та підтриманні гемостатичного балансу крові. Припускається, що протеїни, які входять до складу цієї системи, також лімітують надмірне тромбоутворення, регулюючи клітинну ланку гемостазу [1, 2]. Нативна форма молекули (Glu-плазміноген) є неактивним попередником ключової протеїнази фібринолітичної системи плазміну (EC 3.4.21.7). Крім того, обмежений протеоліз Glu-плазміногену призводить до появи низки фрагментованих молекул, які здатні виконувати самостійні фізіологічні функції. Так, у результаті гідролізу плазміном пептидного зв'язку Lys77-Lys78 (підше Lys78-Val79, Arg68-Met69) та відщеплення фінгер-домену Glu-плазміноген перетворюється на частково деградовану форму – Lys-плазміноген, що має більш відкриту конформацією. Він характеризується більш високою швидкістю активації та спорідненістю до фібрину і мем-

бранних рецепторів порівняно з нативним плазміногеном [3]. Наявність структурно-конформаційних особливостей Lys-плазміногену може зумовлювати унікальні функції цього протеїну, які не притаманні вихідній молекулі.

Питання щодо механізмів утворення Lys-плазміногену в організмі, а також його фізіологічної ролі, досліджені недостатньо. Доведено принципову можливість його утворення з нативного проензиму на поверхні деяких клітин крові, зокрема тромбоцитів [4, 5]. Як відомо, тромбоцитарна плазматична мембрана містить сайти зв'язування для плазміногену і протеїназ-активаторів. Кількість плазміногенових «рецепторів», які експонуються на поверхні тромбоцитів, значно зростає в результаті їх активації [6, 7]. Потенційна роль Lys-плазміногену у регуляції функціональної активності тромбоцитів досліджено недостатньо. Наші попередні експериментальні дані демонструють, що Lys-, на відміну від Glu-плазміногену, пригнічує агрегацію відмитих тромбоцитів лю-

© А.О. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков, Я.М. Рока-Мойя, С.І. Діордієва, Т.В. Гриненко

дини, індуковану тромбіном або колагеном [8]. Крім того, Lys-плазміноген інгібував адекватну реконструкцію актинового цитоскелета тромбоцитів за умов дії активаторів [9]. Відомо, що цитоскелетні структури контролюють цілу низку процесів у тромбоцитах, зокрема секрецію їх  $\alpha$ -гранул [10]. Під час секреції тромбоцити вивільняють компоненти  $\alpha$ -гранул, а саме: фактор V, фібриноген, вітронектин, тромбоспондин тощо. Секреція є ключовим етапом, необхідним для подальшої активації тромбоцитів та індукції вторинної (незворотної) хвилі агрегації. Крім того, речовини, що містяться у складі цих гранул, зумовлюють участь тромбоцитів не лише у процесах згортання, але й у регуляції ними функціонування інших клітин крові та ендотеліоцитів [11]. Як відомо, у результаті агоністіндукованої активації тромбоцитів, що супроводжується екзоцитозом їх  $\alpha$ -гранул, відбувається експонування глікопротеїну Р-селектину (CD62) на поверхні плазматичної мембрани. Тому цей протеїн використовується як чутливий і специфічний маркер активованого стану тромбоцитів, а його детекція методом протокової цитофлуориметрії застосовується для оцінки впливу різних речовин на їх функціональний стан *in vitro* та *in vivo* [12].

Метою нашого дослідження було оцінити вплив Lys-плазміногену на секрецію  $\alpha$ -гранул тромбоцитів за змінами експонування Р-селектину на їх поверхні.

## МЕТОДИКА

Для отримання тромбоцитів плазму відбирали з венозної крові восьми здорових донорів, які протягом двох тижнів не вживали жодних антитромботичних препаратів, використовуючи цитратний буфер як антикоагулянт. Відмивку тромбоцитів від протеїнів плазми проводили поетапним центрифугуванням крові за методикою, описаною раніше [9].

Агрегометричні показники визначали для перевірки життєздатності тромбоцитів

та адекватності клітинної відповіді на дію агоніста за допомогою оптичного агрегометра «SOLAR AT-02» (Республіка Білорусь) з використанням пакета програм «Агрегометр 2.01» не пізніше трьох годин з моменту забору крові. Для активації тромбоцитів використовували тромбін («Sigma Aldrich», США) у концентрації 1,0 од.НІН/мл. Glu- і Lys-форми плазміногену були отримані відповідно до описаних методик [13] та не проявляли спонтанної протеїназної активності. Досліджувані протеїни застосовували в усіх експериментах у концентрації 1,2 мкмоль/л, яка була обрана на основі отриманих раніше результатів [8, 9]. Інгібітор серинових протеїназ аprotинін (Контривен<sup>®</sup>, «Біофарма», Україна) додавали у концентраціях 5 IU/мл або 50 IU/мл [14].

Вплив різних форм плазміногену на секреторну активність тромбоцитів оцінювали методом протокової цитофлуориметрії, визначаючи рівень експонування Р-селектину на поверхні їх плазматичної мембрани. Для проведення дослідження відбирали відмиті клітини з їх концентрату у кількості 2,5 млн. та переносили до 100 мкл HEPES-буфера. Було сформовано експериментальну модель, що складалася з таких груп тромбоцитів: контроль (інтактні клітини); інкубація з Glu- або Lys-плазміногеном (час експозиції – 3 хв.); інкубація з тромбіном (5 хв.); обробка тромбіном (5 хв.) після попередньої інкубації з Glu- або Lys-плазміногеном (3 хв.). Окремо досліджували ефекти Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів за наявності інгібітора серинових протеїназ аprotиніну. Для цього його додавали до інкубаційного середовища у зазначених вище концентраціях та витримували 1 хв перед внесенням протеїну до суспензії клітин.

Усі процедури, пов'язані з інкубацією тромбоцитів, виконували при 22-25 °С для уникнення їх гіперактивації. Відразу після завершення інкубації до тромбоцитів, оброблених досліджуваними молекулами, а також до проб інтактних клітин вносили 20

мкл антитіл до Р-селектину, кон'югованих з фікоеритрином (PE) («Acris Antibodies, Inc.», Сан-Дієго, США). Інкубацію з антитілами проводили протягом 30 хв. за кімнатної температури у темряві. Реакцію зупиняли розведенням суміші, додаючи 1,5 мл 0,05 моль/л натрій-фосфатного буфера (рН 7,4), що містив 0,13 моль/л хлориду натрію. Усі процедури з використанням антитіл виконувалися згідно з рекомендаціями виробника.

Експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів аналізували методом протокової цитофлуориметрії на приладі COULTER EPICS XL («Beckman Coulter», США), який оснащено аргонним лазером ( $\lambda_{\text{збудж.}} = 488$  нм). Кількісну оцінку цього показника проводили з використанням двох показників: 1) відсоток Р-селектинпозитивних клітин від їх загальної кількості, 2) інтенсивність флуоресценції, детекцію котрої здійснювали за каналом FL3 (620-630 нм). Для сортигу тромбоцитів попередньо встановлювали відповідні гейти (гейт 1 – популяція Р-селектиннегативних клітин, гейт 2 – популяція Р-селектинпозитивних клітин). Зміни сигналу флуоресценції визначали за зсувом її кривих відносно маркера ( $M$ ), який встановлено за цим показником для контрольної групи, та виражали в умовних одиницях, які являли собою десятковий логарифм величин за шкалою Log FL3. Було проаналізовано не менше 10 тис. подій у кожному зразку. Цитометричні показники у кожній групі клітин вимірювали у двох паралелях, розраховуючи потім середні для відповідних величин, отриманих від усіх донорів ( $n = 8$ ). Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3 («De Novo Software», США), числові характеристики представлені як середні значення  $\pm$  стандартна похибка середньої. Статистичну обробку результатів проводили із використанням критерію  $t$  Ст'юдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У представленій роботі вперше продемонстровано вплив Lys-форми плазміногену на секреторну активність тромбоцитів та можливість модуляції цим протеїном тромбіндукованого екзоцитозу. За результатами цитометричного аналізу, частка Р-селектинпозитивних клітин у препаратах інтактних тромбоцитів (контроль) становила  $48 \pm 4,6$  % від їх загальної кількості (рис. 1). Кількість спонтанно активованих тромбоцитів залежить від способу їх отримання та варіює від 50 до 92 % [15], тому отримані за нашою методикою клітини були придатні для подальшої роботи з ними. При інкубації тромбоцитів з тромбіном активується переважна більшість клітин, на що вказує практично повний їх перерозподіл до популяції Р-селектинпозитивних тромбоцитів ( $97 \pm 2,3$  %,  $P < 0,05$  порівняно з контролем). Вплив Lys-плазміногену призводить до незначного, але статистично вірогідного, зростання пулу тромбоцитів, що презентують Р-селектин ( $78 \pm 2,1$  %). Останнє спостереження свідчить про те, що порівняно з дією тромбіну, вплив Lys-плазміногену викликає лише часткове вивільнення  $\alpha$ -гранул. Важливий результат отримано на клітинах, котрі активували тромбіном після преінкубації з Lys-плазміногеном. Виявлено меншу кількість тромбоцитів у популяції, яка обмежена гейтом 2 порівняно з клітинами, обробленими лише тромбіном ( $85 \pm 1,6$  %,  $P < 0,05$ ).

Зміни між значеннями інтенсивності сигналу флуоресценції інтактних та інкубованих з досліджуваними протеїнами тромбоцитів мали тенденцію, аналогічну тій, що продемонстровано відносно кількісного перерозподілу клітин (рис. 2). У разі з тромбоцитами, інкубованими з тромбіном, спостерігається істотний зсув піку кривої флуоресценції праворуч, що відповідає підсиленню сигналу флуоресценції у 13,8 разів порівняно з таким показником для інтактних клітин ( $P < 0,05$ ). Інтенсивність флуоресценції популяції у

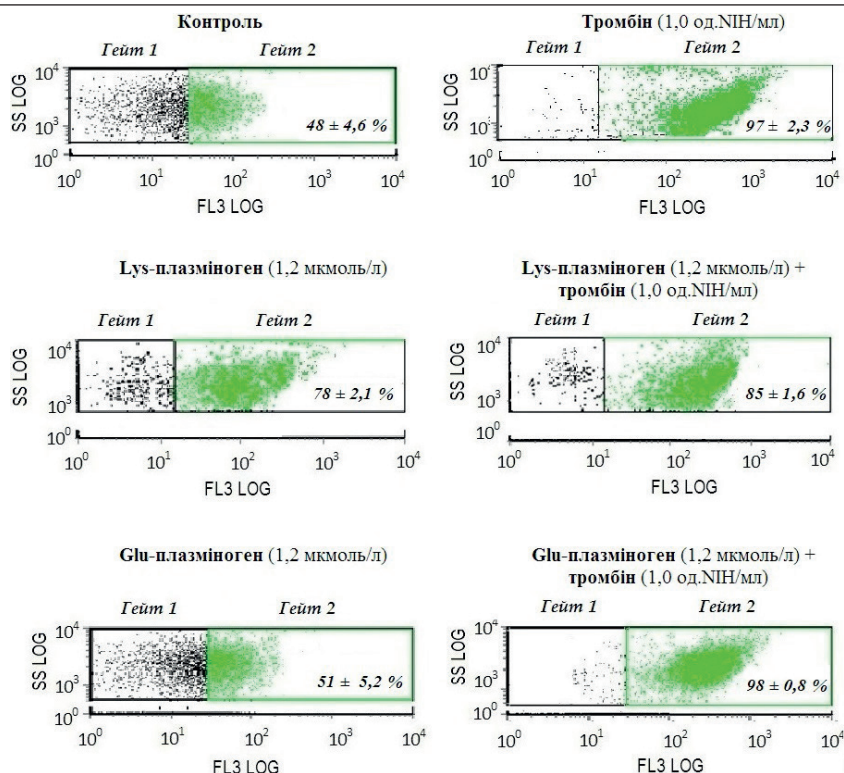


Рис. 1. Вплив Lys- (1,2 мкмоль/л) та Glu-форм плазміногену (1,2 мкмоль/л) на експонування Р-селектину відмитими тромбоцитами людини (популяції Р-селектинпозитивних тромбоцитів на гістограмах обмежені гейтом 2)

гейт 2 за умов впливу Lys-плазміногену перевищувала контрольні значення приблизно втричі ( $P < 0,05$ ). Lys-плазміноген частково пригнічував тромбініндуковану секрецію  $\alpha$ -гранул, про що свідчить дворазове зменшення флуоресцентного сигналу порівняно з цим показником у клітин за ізольованої дії агоністу ( $P < 0,05$ ).

На відміну від Lys-форми, нативний проензим (Glu-плазміноген) не викликав статистично вірогідних змін секреторної активності тромбоцитів як у результаті його ізольованої дії, так і за умов тромбініндукованої активації (див. рис. 1 і 2). Отримані результати збігаються з попередніми, які свідчать, що нативна форма плазміногену не впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів і не змінює їх агрегативну активність [9].

Відомо, що перетворення плазміногену на активну протеїназу на поверхні тромбоцитів, як це показано, зокрема, у пацієнтів зі штучним серцево-легеневим кровообігом, є фак-

тором ризику виникнення гіперагрегативного стану та тромбоемболії судин. Показано [16], що плазмін у кількості 0,8 CU/мл індукував секрецію та агрегацію відмитих тромбоцитів, які пригнічувалися за наявності 50 IU/мл аprotиніну, що вказує на провідну роль у цих процесах протеїназної активності плазміну. Виявилося, що він здатний активувати тромбоцити через розщеплення рецептора PAR-4 [17]. Однак інкубація тромбоцитів за наявності плазміну, який було взято у меншій концентрації (0,2 CU/мл), призвела до практично повного пригнічення агрегації. При цьому плазмін інгібував внутрішньоклітинні процеси, індуковані тромбіном, а саме: рилізінг серотоніну та зростання вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  [14]. Результати дослідження Shigeta та співавт. [16] демонструють, що плазміноген здатний інгібувати плзмініндуковану активацію та секрецію тромбоцитів, однак повного їх інгібування не спостерігається навіть за наявності зимогену у кількості, що у чоти-



ри рази перевищує концентрацію ензиму. Протилежний характер ефектів плазміну на функціональний стан тромбоцитів указує на існування множинних шляхів проведення сигналу до середини клітини, на які можуть впливати плазміноген/плазмін. Очевидно, що різні структурно-функціональні частини цих протеїнів визначають специфіку відповіді

тромбоцитів. Отже, наступне питання, яке підлягало експериментальній перевірці у нашій роботі, стосувалося можливої участі активного центру плазміну, який міг утворитися з проензиму на поверхні тромбоцитів, до змін їх секреторної активності. Проведені цитометричні дослідження свідчать про те, що апротинін не впливає на зміни кількості

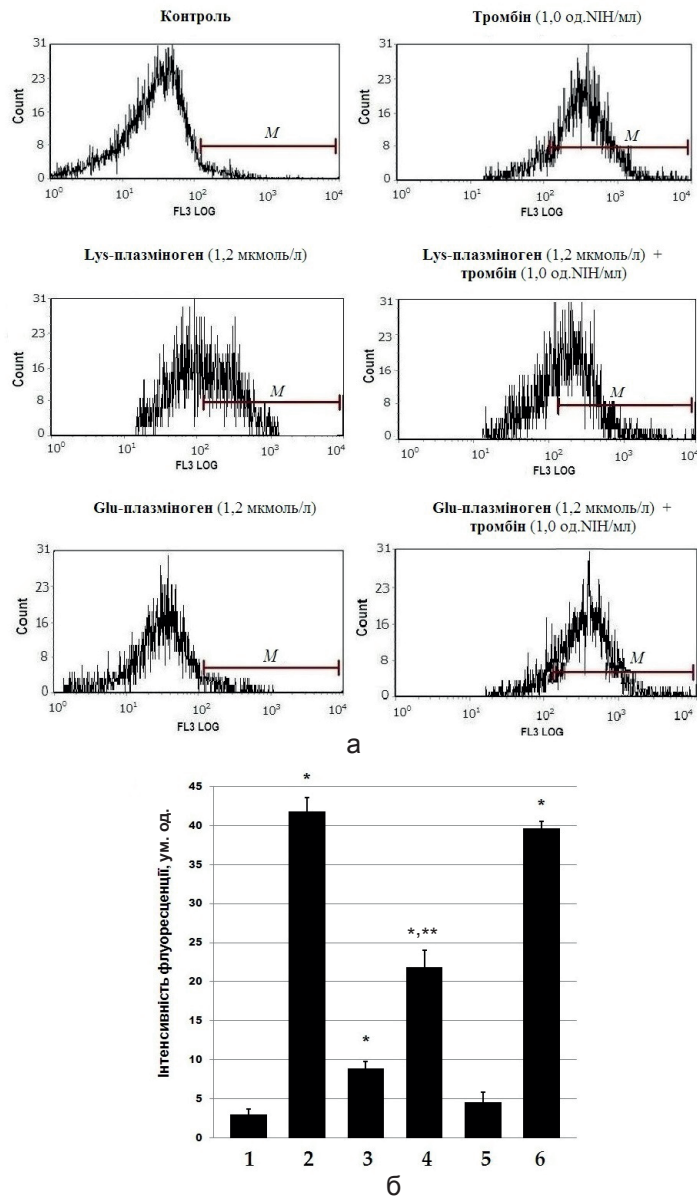


Рис. 2. Ефекти Lys- та Glu-форм плазміногену на інтенсивність флуоресценції за каналом FL3, яка характеризує зв'язування антитілу проти Р-селектину, кон'югованих з фікоеритрином, з відмитими тромбоцитами людини: а – репрезентативні гістограми піків флуоресценції; б – результати кількісного аналізу інтенсивності сигналу.

\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* порівняно з клітинами, обробленими тромбіном

Р-селектинпозитивних клітин та сигналу флуоресценції, індуковані Lys-плазміногеном (рис. 3). Отже, отримані результати дають змогу припустити, що за створених експериментальних умов вплив Lys-плазміногену на секреторні механізми тромбоцитів не пов'язаний з появою протеїназної активності, а, вірогідно, опосередковується його некаталітичними (крингловими) доменами.

Питання щодо механізмів утворення Lys-плазміногену клітинами та можливого фізіологічного значення цієї молекули залишаються дискусійними. За допомогою антитіл, специфічних до Lys-плазміногену, цю форму проензиму вперше виявили у плазмі крові пацієнтів під час тромболітичної терапії [18]. Пізніше було доведено, що генерація Lys-плазміногену відбувається локально, тому він не циркулює у системному кровотоці здорових донорів. Його було визначено імуногістохімічно на поверхні макрофагів в осередках запалення [19], а також на поверхні ендотеліоцитів судин різних органів як у нормі, так і під час хронічних запальних процесів [20]. Досліджено механізм перичелюлярної активації плазміногену на поверхні моноцитів [5] та ендотеліоцитів [4]. Автори

підкреслюють важливість того, що генерація Lys-плазміногену забезпечує високу ефективність примембранної активації зимогену з утворенням плазміну. Важливе припущення, яке було висунуто на підставі отриманих ними результатів, стосується можливості регуляції кількості Lys-плазміногену, що утворюється, залежно від функціонального стану клітин. Результати нашого дослідження розширюють уявлення про механізми дії та значення цього протеїну у функціонуванні тромбоцитів. Вірогідно, що Lys-плазміноген виступає не лише проміжною стадією на шляху до появи активної протеїнази, але й може виконувати альтернативні функції як сигнальна молекула, які не властиві ані Glu-формі плазміногену, ані плазміну. Існуючі численні експериментальні докази вказують на наявність функціонального зв'язку між цитоскелетом тромбоцитів та їх секреторною активністю. Саме актинові мікрофіламенти контролюють переміщення гранул усередині тромбоциту, їх централізацію, злиття з плазматичною мембраною та вивільнення [10, 21]. У нашій попередній роботі [9] встановлено, що Lys-плазміноген запобігає адекватній реконструкції актинового цитоскелета, індукованої тромбіном, перешкоджаючи

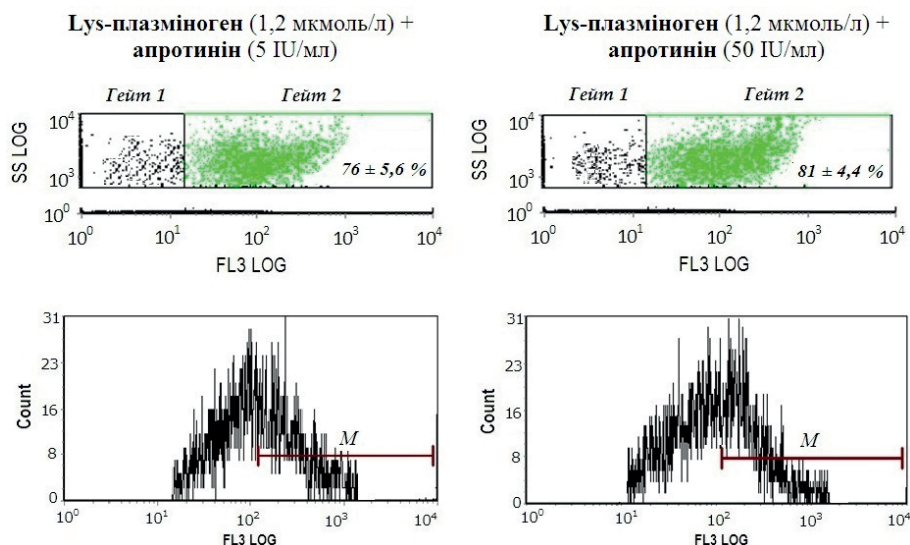


Рис. 3. Вплив Lys-плазміногену на експонування Р-селектину відмитими тромбоцитами людини за наявності аprotиніну

асоціації мембранного кортекса з філаментним апаратом цитозолу. Можна припустити, що зазначені ефекти Lys-плазміногену є наслідком аберантної збірки актинового цитоскелета, як це показано раніше у дослідках з використанням агентів-інгібіторів полімеризації актину, зокрема цитохалазину Н [22]. Можливо, що саме зрушення цитоскелетних структур, викликане Lys-плазміногеном, спричинює часткову секрецію  $\alpha$ -гранул, але водночас унеможлиблює нормальну відповідь тромбоцитів на дію агоніста.

Слід зауважити, що порушення секреції  $\alpha$ -гранул може призводити до розвитку різних тромбоцитопатій, у патогенезі яких провідну роль відіграє недостатність функції Р-селектину. Цей глікопротеїн, що експонується активованими тромбоцитами, є основним компонентом, який бере участь у взаємодії тромбоцитів з нейтрофілами та моноцитами і, таким чином, відповідає за утворення тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів. Крім того, як рецептор Р-селектин відіграє значну роль у стабілізації тромбоцитарних агрегатів, а також залучається до ролінгу тромбоцитів на поверхні активованих ендотеліальних клітин [23, 24]. Отримані результати свідчать про те, що один із шляхів регуляції функціональних взаємодій тромбоцитів може реалізовуватися через модуляцію експонування Р-селектину, опосередковану Lys-плазміногеном. Подальші дослідження можуть бути корисними для розкриття молекулярних механізмів регуляції протеїнами плазміноген/плазмінової системи функціонування тромбоцитарної ланки гемостазу. Вирішення цих питань необхідне для розробки принципово нових підходів для корекції численних патологій, асоційованих з підвищеною активністю тромбоцитів та надмірним тромбоутворенням.

## ВИСНОВКИ

1. Lys-форма плазміногену сприяє неповному рилізінгу  $\alpha$ -гранул відмитих тромбоцитів

людини та частково пригнічує їх тромбініндуковану секрецію.

2. Вплив Lys-плазміногену на екзоцитоз тромбоцитів не пов'язаний з утворенням активної протеїнази плазміну, а реалізується завдяки взаємодіям його некаталітичних (кринглових) доменів з рецепторними молекулами на поверхні тромбоцитів.

3. Нативна форма плазміногену (Glu-плазміноген) не впливає на секреторну активність тромбоцитів.

4. Отримані результати дають змогу розглядати порушення агоніст-індукованої секреції  $\alpha$ -гранул тромбоцитів як один з механізмів антиагрегативної активності Lys-плазміногену.

*Колектив авторів висловлює щире подяку молодшому науковому співробітнику Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України М.М. Гузику за технічну допомогу та обговорення результатів.*

**А.А. Тихомиров, Д.Д. Жерносеков,  
Я.М. Рока-Мойя, С.И. Диордиева, Т.В. Гриненко**

## ВЛИЯНИЕ LYS-ПЛАЗМИНОГЕНА НА СЕКРЕЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Оценивали эффекты Lys-плазминогена на секрецию  $\alpha$ -гранул тромбоцитов. Как маркер экзоцитоза использовали Р-селектин, уровень экспонирования которого на плазматической мембране отмытых тромбоцитов человека определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Установлено, что Lys-плазминоген вызывает неполное высвобождение содержимого  $\alpha$ -гранул, но в то же время угнетает тромбининдуцированную секрецию тромбоцитов. Его эффекты на секреторные процессы в тромбоцитах не связаны с образованием активной протеиназы плазмина, а, вероятно, реализуются благодаря взаимодействиям некаталитических (крингловых) доменов молекулы с мембранными рецепторами. В отличие от Lys-формы, нативный профермент (Glu-плазминоген) не вызывал изменений секреторной активности тромбоцитов. Таким образом, в представленной работе впервые продемонстрирована способность Lys-плазминогена модулировать секрецию  $\alpha$ -гранул тромбоцитов, что может рассматриваться как один из возможных механизмов реализации его антиагрегативной активности.

Ключевые слова: тромбоциты; секреция тромбоцитов;  $\alpha$ -гранулы; Р-селектин; плазминоген; проточная цитофлуориметрия.

**A.A. Tykhomyrov, D.D. Zhernosekov, Y.M. Roka-Moya, S.I. Diordieva, T.V. Grinenko**

## THE EFFECTS OF LYS-PLASMINOGEN ON HUMAN PLATELET SECRETION

The effects of Lys- plasminogen on platelet  $\alpha$ -granule secretion were studied. The level of P-selectin exposed on the surface of plasma membranes of washed human platelets was measured by flow cytometry as a marker of  $\alpha$ -granule secretion. It was shown that Lys- plasminogen facilitates partial release of  $\alpha$ -granules, but impedes thrombin-induced platelet exocytosis. It is suggested that Lys- plasminogen may affect platelet secretion rather through interaction of its non-catalytic (kringle) domains with membrane receptors than due to contaminating plasmin activity. In contrast to Lys-form, native proenzyme (Glu-plasminogen) had no effects on  $\alpha$ -granule releasing. Here, we provide the first experimental demonstration that Lys-form of plasminogen is able to modulate platelet  $\alpha$ -granule secretion, and this effect can be considered as one of the plausible mechanisms of its anti-aggregating activity.

Key words: platelets; platelet secretion;  $\alpha$ -granules; P-selectin; plasminogen; flow cytometry.

*Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## REFERENCES

1. Law RH, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr Opin Struct Biol.* 2013; 23(6): 836-41.
2. Zhernosekov DD, Iusova EI, Grinenko TV. Role of plasminogen/plasmin in functional activity of blood cells. *Ukr Biokhim Zh.* 2012; 84(4): 5-19. [Russian].
3. Miles LA, Castellino FJ, Gong Y. Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(1): 21-30.
4. Gong Y, Kim SO, Felez J, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 2001; 276(22): 19078-83.
5. Zhang L, Gong Y, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoic cell surface. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(6): 1264-70.
6. Miles LA, Plow EF. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem.* 1985; 260(7): 4303-11.
7. Baeten KM, Richard MC, Kanse SM, Mutch NJ, Degen JL, Booth NA. Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by platelet-associated plasminogen: a mechanism for stimulation of fibrinolysis by platelets. *J Thromb Haemost.* 2010; 8(6): 1313-22.
8. Roka-Moya YM, Zhernosekov DD, Grinenko TV. Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation. *Biopolymers and Cell.* 2012; 28(5): 352-356. [Ukrainian].
9. Tykhomyrov AO, Zhernosekov DD, Roka-Moya IM, Diordieva SI, Grinenko TV. Effects of Lys-form of plasminogen on platelet actin cytoskeleton. *Fiziol Zh.* 2014; 60(1): 25-33. (in Ukrainian)
10. Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood.* 2005; 105(10): 3879-87.
11. Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004; 126(3): 298-306.
12. Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006; 35(1-2): 67-82.
13. Kim PY, Tieu LD, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JJ. A high affinity interaction of plasminogen with fibrin is not essential for efficient activation by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 2012; 287(7): 4652-61.
14. Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Rand ML, Packham MA. Pretreatment of human platelets with plasmin inhibits responses to thrombin, but potentiates responses to low concentrations of aggregating agents, including the thrombin receptor activating peptide, SFLRN. *Thromb Haemost.* 1997; 77(4): 741-7.
15. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 273(2): 565-70.
16. Shigeta O, Kojima H, Jikuya T, Terada Y, Atsumi N, Sakakibara Y, Nagasawa T, Mitsui T. Aprotinin inhibits plasmin-induced platelet activation during cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1997; 96(2): 569-74.
17. Quinton TM, Kim S, Derian CK, Jin J, Kunapuli SP. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem.* 2004; 279(18): 18434-9.
18. Holvoet P, Lijnen HR, Collen D. A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen. Application to the study of the activation pathways of plasminogen in vivo. *J Biol Chem.* 1985; 260(22): 12106-11.
19. Silverstein RL, Friedlander RJ Jr, Nicholas RL, Nachman RL. Binding of Lys-plasminogen to monocytes/macrophages. *J Clin Invest.* 1988; 82(6): 1948-55.
20. Hajjar KA, Nachman RL. Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface. *J Clin Invest.* 1988; 82(5): 1769-78.
21. Woronowicz K, Dilks JR, Rozenvayn N, Dowal L, Blair PS, Peters CG, et al. The platelet actin cytoskeleton associates with SNAREs and participates in alpha-granule secretion. *Biochemistry.* 2010; 49(21): 4533-42.
22. Natarajan P, May JA, Sanderson HM, Zabe M, Spangenberg P, Heptinstall S. Effects of cytochalasin H, a potent inhibitor of cytoskeletal reorganization, on platelet function. *Platelets.* 2000; 11(8): 467-76.
23. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets



determines size and stability of platelet aggregates.  
Circulation. 2000; 102(16): 1931-6.  
24. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets

roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction  
mediated by endothelial P-selectin. Proc Natl Acad Sci U  
S A. 1995; 92(16): 7450-4.

*Матеріал надійшов до  
редакції 23.03.2015*